

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/353

A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02111627.X

[43] 公开日 2003 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 1444935A

[22] 申请日 2002.5.9 [21] 申请号 02111627.X

[71] 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路 130 号

[72] 发明人 魏东芝 刘建文 梅郁盈

[74] 专利代理机构 上海顺华专利代理有限责任公  
司

代理人 陈淑章

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 表没食子儿茶素没食子酸酯在抗肿瘤药物中应用

[57] 摘要

本发明将茶中提取主要成分为表没食子儿茶素没食子酸酯(( - ) - epigallocatechin gallate, EGCG) 应用于治疗肿瘤药物中。该提取物不仅能抑制肿瘤细胞增殖、同时具有使肿瘤细胞不易产生耐药性和提高肿瘤细胞对治疗药物的敏感性作用。本发明提出该天然提取物可作为抗肿瘤药物的增敏剂和增效剂。

ISSN 1008-4274

- 1、表没食子儿茶素没食子酸酯在抗肿瘤药物中应用，其特征在于，表没食子儿茶素没食子酸酯作为抗肿瘤药物的增敏剂和增效剂。

## 表没食子儿茶素没食子酸酯在抗肿瘤药物中应用

## 技术领域

本发明涉及表没食子儿茶素没食子酸酯的用途。

## 技术背景

多药抗药性 (multidrug resistance, MDR) 是指癌细胞接触一种抗肿瘤药物并产生抗药性的同时, 对结构和作用机理不同的多种抗肿瘤药物产生交叉抗药性。肿瘤病人在经过化疗后, 往往会产生多药抗药性。多药抗药性是导致肿瘤化疗失败的主要原因, 也是肿瘤化疗急需解决的难题之一。多药抗药性的形成机理复杂。肿瘤细胞可通过不同途径导致 MDR 的产生, 同时, 单个 MDR 细胞可同时存在多种抗药性的机制。任何一种或多种机制联合作用均可导致 MDR 的产生。

MDR 的逆转剂与抗癌药物合用, 将会大幅度地提高化疗药物对 MDR 肿瘤的疗效。尽管许多化合物或药物具有体外逆转 MDR 的作用, 但由于毒副作用很大, 无临床应用价值。作为临床应用的 MDR 逆转剂的药物, 至今尚未开发成功。因此, 寻找低毒、不易产生 MDR 的物质或有效的 MDR 逆转物质是肿瘤化疗治疗领域急需解决的难题, 也具有重要的经济效益和社会效益。

## 发明内容

本发明需要解决的技术问题是提高肿瘤细胞对治疗药物的敏感性和增加治疗药物效用, 克服现有肿瘤治疗药物使用过程中存在 MDR 作用, 提高治疗肿瘤的临床效果。

## 技术方案:

1, 确立 EGCG 对 MDR 靶细胞的细胞毒性作用的参数。

用 DMEM 培养液稀释 EGCG 成 10-100  $\mu\text{g/ml}$ 。采用噻唑蓝 (MTT) 快速比色法测定 EGCG 对 MDR 靶细胞的细胞毒性作用。将对数生长期 MDR 靶细胞  $10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于 96 孔培养板, 每孔 0.2ml, 分别加入 10-100  $\mu\text{g/ml}$  浓度的 EGCG 处理, 每浓度平行 4 孔, 对照组加等量体积的培养液, 置 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  及饱

和湿度的培养箱培养 1-4 天, 实验终止前 4 小时每孔加入  $5\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  MTT  $10\mu\text{l}$ , 培养结束后每孔加入  $0.04\text{N}$  DMSO (二甲基亚砷), 每孔  $150\mu\text{l}$ , 振荡  $10\text{min}$ , 是 MTT 还原产物完全溶解, 用 BioRad 550 型酶标仪, 以  $550\text{nm}$  为实验波长,  $655\text{nm}$  为参照波长测定其吸收度, 计算 MDR 靶细胞的存活率和药物对 MDR 靶细胞的抑制率, 并以药物的不同浓度和细胞的存活率作图, 确定细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 参数。

2. 用 EGCG 提高 MDR 靶细胞对治疗药物的敏感性和增加治疗药物效用,

参照上述细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ), 将对数生长期 MDR 靶细胞  $10^4\text{cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于 96 孔培养板, 每孔  $0.2\text{ml}$ , 先分别加入半数抑制浓度以内的 EGCG 处理 MDR 靶细胞, 然后加入作为代表的抗癌药阿霉素, 浓度范围为  $0-32\mu\text{g}/\text{ml}$ , 每组平行 4 孔, 可以提高多药抗药性癌细胞株对化疗药物的敏感性, 增强化疗药物的作用效果,

本发明的显著的优点和技术上的进步:

本发明提供的肿瘤化疗药物增敏剂和增效剂, 克服了 EGCG 的传统用途, 将其作为新型的肿瘤化疗药物增敏剂和增效剂, 可以提高多药抗药性癌细胞株对化疗药物的敏感性, 增强化疗药物的作用效果, 具有良好的应用前景。

#### 附图说明

图 1. 不同浓度 EGCG 不同作用时间下对药物敏感性细胞 (KB-3-1) 的细胞毒性

图 2 不同浓度 EGCG 不同作用时间下对 MDR 细胞 (KB-A-1) 的细胞毒性

图 3 不同浓度的三种抗癌药物对 KB-3-1 的细胞毒性

图 4 不同浓度的三种抗癌药物对 KB-A-1 的细胞毒性

图 5 EGCG 对 KB-3-1 和 KB-A-1 存活率的影响

图 6 EGCG 对 KB-A-1 多药抗药性的逆转作用

#### 具体实施方式

下面通过实施例对本发明作进一步的说明, 但其并不影响本发明的保护范围:

#### 实施例 1

EGCG 对 MDR 细胞 (KB-A-1) 和药物敏感性细胞 (KB-3-1) 的细胞毒性作用。

EGCG 购自 Sigma 公司, 用 DMEM 培养液稀释成所需浓度。采用噻唑蓝 (MTT) 快速比色法测定 EGCG 对 MDR 细胞 (KB-A-1) 和药物敏感性细胞 (KB-3-1) 的细胞毒性作用。将对数生长期细胞  $10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于 96 孔培养板, 每孔 0.2ml, 分别加入一定浓度的 TP 和 EGCG 处理, 每浓度平行 4 孔, 对照组加等量体积的培养液, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的培养箱培养 1-4 天, 实验终止前 4 小时每孔加入  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  MTT  $10 \mu\text{l}$ , 培养结束后每孔加入 0.04 N DMSO (二甲基亚砜), 每孔  $150 \mu\text{l}$ , 振荡 10 min, 是 MTT 还原产物完全溶解, 用 BioRad 550 型酶标仪, 以 550 nm 为实验波长, 655 nm 为参照波长测定其吸收度, 计算肿瘤细胞的存活率和药物对细胞的抑制率, 并以药物的不同浓度和细胞的存活率作图, 确定细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。实验结果如下:

表 1. 不同浓度 EGCG 不同作用时间下对 KB-3-1 的抑制率

药物浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	抑制率 (%)			
	24h	48h	72h	96h
0	$0 \pm 0.082$	$0 \pm 0.094$	$0 \pm 0.097$	$0 \pm 0.128$
10	$7.40 \pm 0.095$	$10.19 \pm 0.093$	$21.54 \pm 0.184$	$32.45 \pm 0.119$
20	$30.86 \pm 0.106$	$34.50 \pm 0.147$	$42.02 \pm 0.136$	$44.12 \pm 0.151$
30	$43.70 \pm 0.127$	$46.18 \pm 0.136$	$50.06 \pm 0.105$	$69.15 \pm 0.137$
40	$49.49 \pm 0.108$	$52.53 \pm 0.153$	$61.32 \pm 0.139$	$74.81 \pm 0.158$
50	$52.32 \pm 0.117$	$56.36 \pm 0.129$	$68.38 \pm 0.144$	$82.79 \pm 0.154$
60	$54.05 \pm 0.135$	$63.64 \pm 0.191$	$68.91 \pm 0.154$	$83.33 \pm 0.088$
70	$55.86 \pm 0.118$	$64.07 \pm 0.138$	$70.25 \pm 0.182$	$86.40 \pm 0.173$
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	41.43	36.50	27.49	26.80



表 2. 不同浓度 EGCG 不同作用时间下对 KB-A-1 的抑制率

EGCG 浓度 ( $\mu$ g/ml)	抑制率 (%)			
	24h	48h	72h	96h
0	0 $\pm$ 0.099	0 $\pm$ 0.166	0 $\pm$ 0.091	0 $\pm$ 0.164
10	2.77 $\pm$ 0.184	4.85 $\pm$ 0.125	5.33 $\pm$ 0.155	5.78 $\pm$ 0.145
20	3.46 $\pm$ 0.192	11.19 $\pm$ 0.085	32.03 $\pm$ 0.109	33.07 $\pm$ 0.137
30	15.67 $\pm$ 0.135	24.62 $\pm$ 0.166	41.35 $\pm$ 0.116	52.89 $\pm$ 0.111
40	16.23 $\pm$ 0.146	37.90 $\pm$ 0.122	52.84 $\pm$ 0.147	65.92 $\pm$ 0.158
50	18.1 $\pm$ 0.132	42.74 $\pm$ 0.172	55.21 $\pm$ 0.144	67.97 $\pm$ 0.126
60	26.68 $\pm$ 0.055	51.45 $\pm$ 0.178	63.03 $\pm$ 0.059	80.32 $\pm$ 0.142
IC50 ( $\mu$ g/ml)	158.42	59.97	32.66	27.89

以上实施例说明, EGCG 均具有良好的杀灭肿瘤细胞的作用, 不论是对多药抗药性细胞还是药物敏感细胞都可产生相同的抑制效果, 而且这种抑制效果还具有剂量依赖性, 并随着作用时间的延长而程度加深效果加强。

#### 实施例 2

EGCG 与传统的肿瘤化疗药物耐药倍数比较。

采用 MTT 法 (具体实验操作参照实施例 1) 考察三种临床上较为常用的抗癌药物阿霉素、秋水仙素和长春花碱不同浓度一定作用时间下 (三天) 对 KB-3-1 和 KB-A-1 的细胞毒性, 以药物的不同浓度和细胞的存活率作图, 确定细胞的半数抑制浓度, 计算耐药倍数 (resistance factor,  $RF = IC_{50}(KB-A-1) / IC_{50}(KB-3-1)$ ), 并将 EGCG 相同作用时间下与这三种传统的肿瘤化疗药物耐药倍数进行比较。实验结果见图 3、图 4、图 5 及下表:

表3 EGCG 与传统的肿瘤化疗药物耐药倍数比较

IC <sub>50</sub> (ng/ml)	Dox	Col	Vin	EGCG
KB-3-1	69.48	6.89	37.89	27490
KB-A-1	8320	770	2610	32660
Resistance factor	119.75	111.76	68.88	1.19

以上实施例说明, KB-A-1 细胞具有非常明显的抗药性而 KB-3-1 对药物的反应却非常敏感。Ng 数量级浓度的药物即可起到杀灭 KB-3-1 的作用, 但要达对 KB-A-1 到同样的抑制效果药物浓度却要至少提高 70 倍。与之相比较的 EGCG, 不同浓度的 EGCG 相同作用时间下对敏感型细胞株和抗药型细胞株的影响趋势基本一致。将 EGCG 不同作用时间下对敏感型细胞株和抗药型细胞株的半数抑制浓度对比, 发现它们对两细胞株的抑制效果无太大区别, 说明 EGCG 对癌细胞的抑制效果在敏感型菌株和抗药型菌株都能收到良好的效果, 说明在不产生耐药性方面优于传统药物。

### 实施例 3:

#### EGCG 对阿霉素抗癌效果的影响:

将对数生长期细胞  $10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  接种于 96 孔培养板, 每孔 0.2ml, 先分别加入  $40 \mu\text{g/ml}$   $10 \mu\text{g/ml}$  EGCG 处理, 然后加入阿霉素, 浓度范围为  $0-32 \mu\text{g/ml}$ , 每组平行 4 孔, 对照组加等量体积的培养液, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的培养箱培养培养 3 天, 实验终止前 4 小时每孔加入  $5 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  MTT  $10 \mu\text{l}$ , 培养结束后每孔加入 0.04 N DMSO (二甲基亚砷), 每孔  $150 \mu\text{l}$ , 振荡 10 min, 是 MTT 还原产物完全溶解, 用 BioRad 550 型酶标仪, 以 550 nm 为实验波长, 655 nm 为参照波长测定其吸收度, 求出半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 计算逆转倍数 (reversal index, RI)。实验结果见图 6。

从图 6 可以看出: 经过  $10 \mu\text{g/ml}$  的 EGCG 处理后, 耐药细胞株 KB-A-1 对阿霉素的 IC<sub>50</sub> 从  $10.35 \mu\text{g/ml}$  降到了  $5.45 \mu\text{g/ml}$  逆转倍数分别达到了 1.90。经过无细胞毒性的 EGCG 与阿霉素共同作用后, 细胞的存活率由单独使用阿霉素的 55.77% 分

别下降到 40.31%，而且这种增敏作用非常明显而且不是经过累加作用得到的。由此可以得出：茶类提取物质具有提高多药抗药性细胞株对抗癌药物敏感性的作用，即可以逆转多药抗药性。



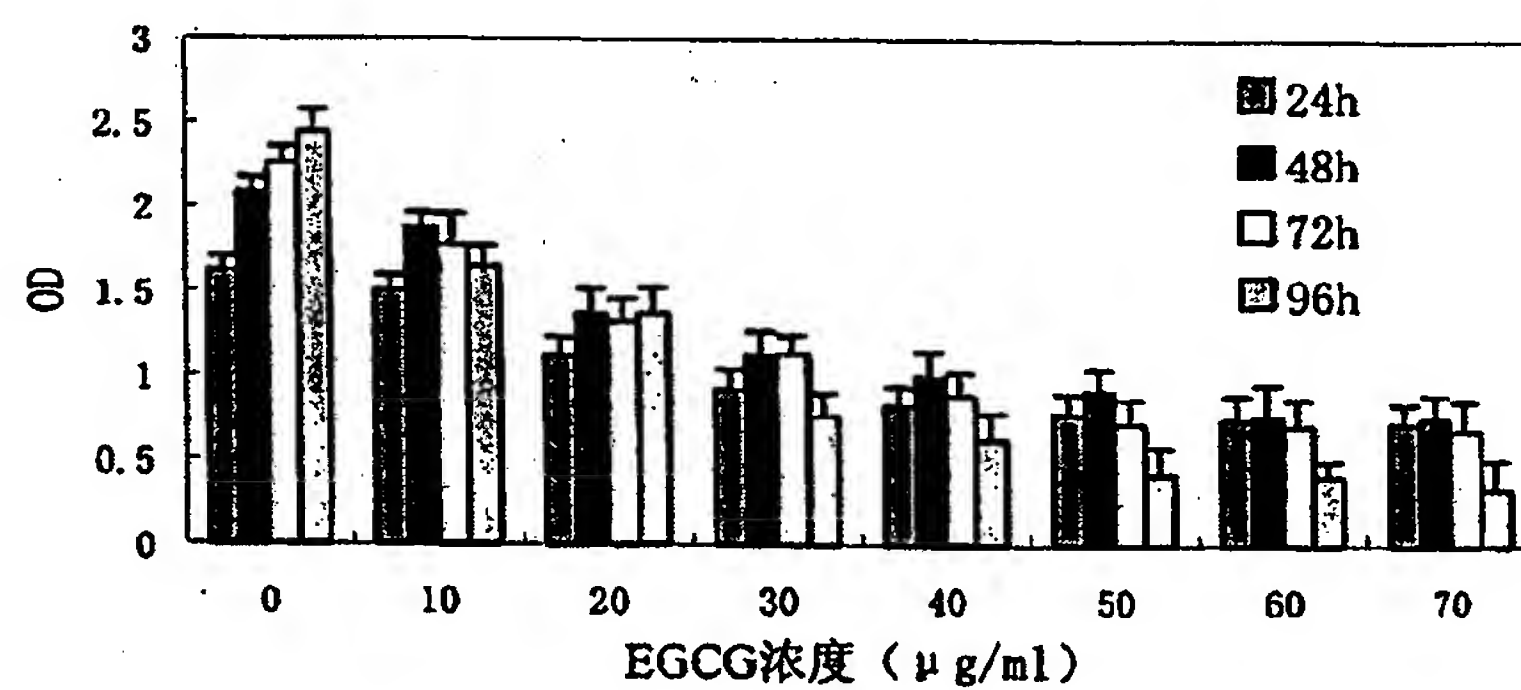


图 1

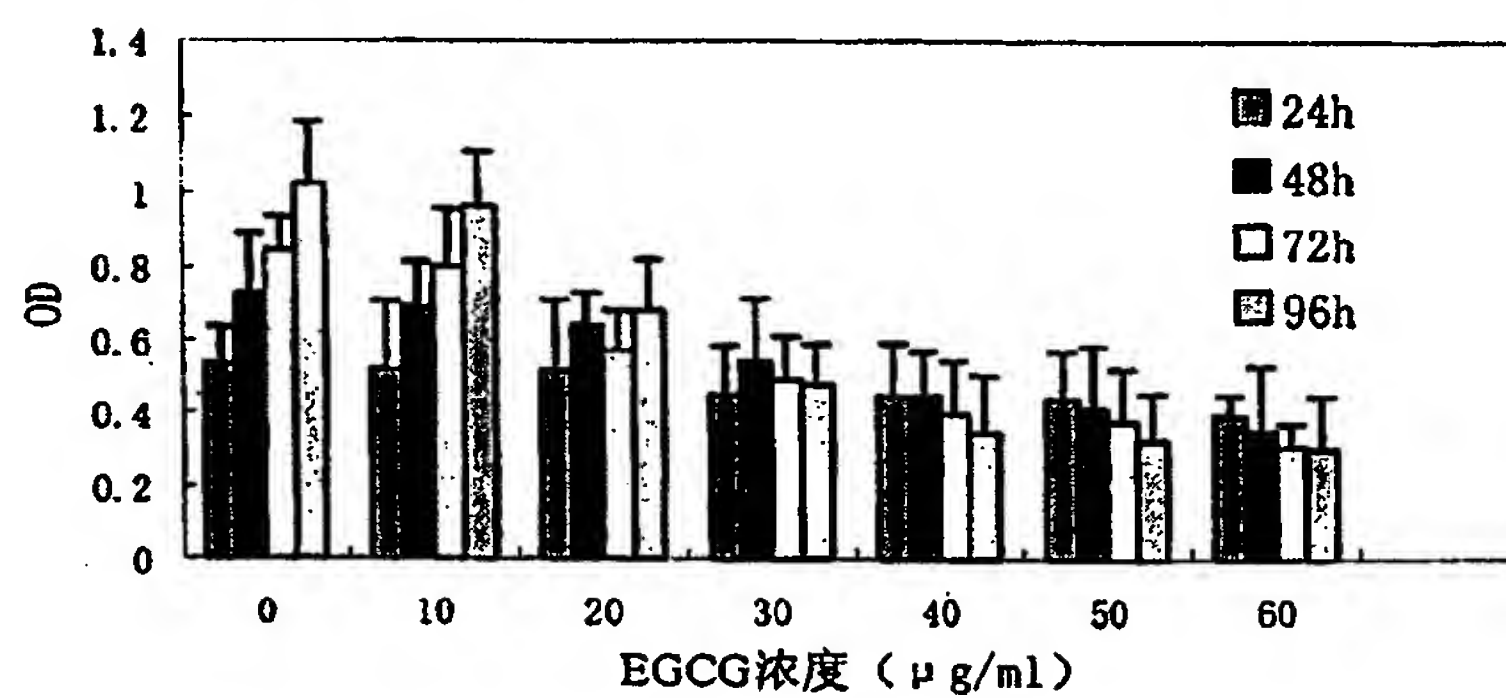


图 2

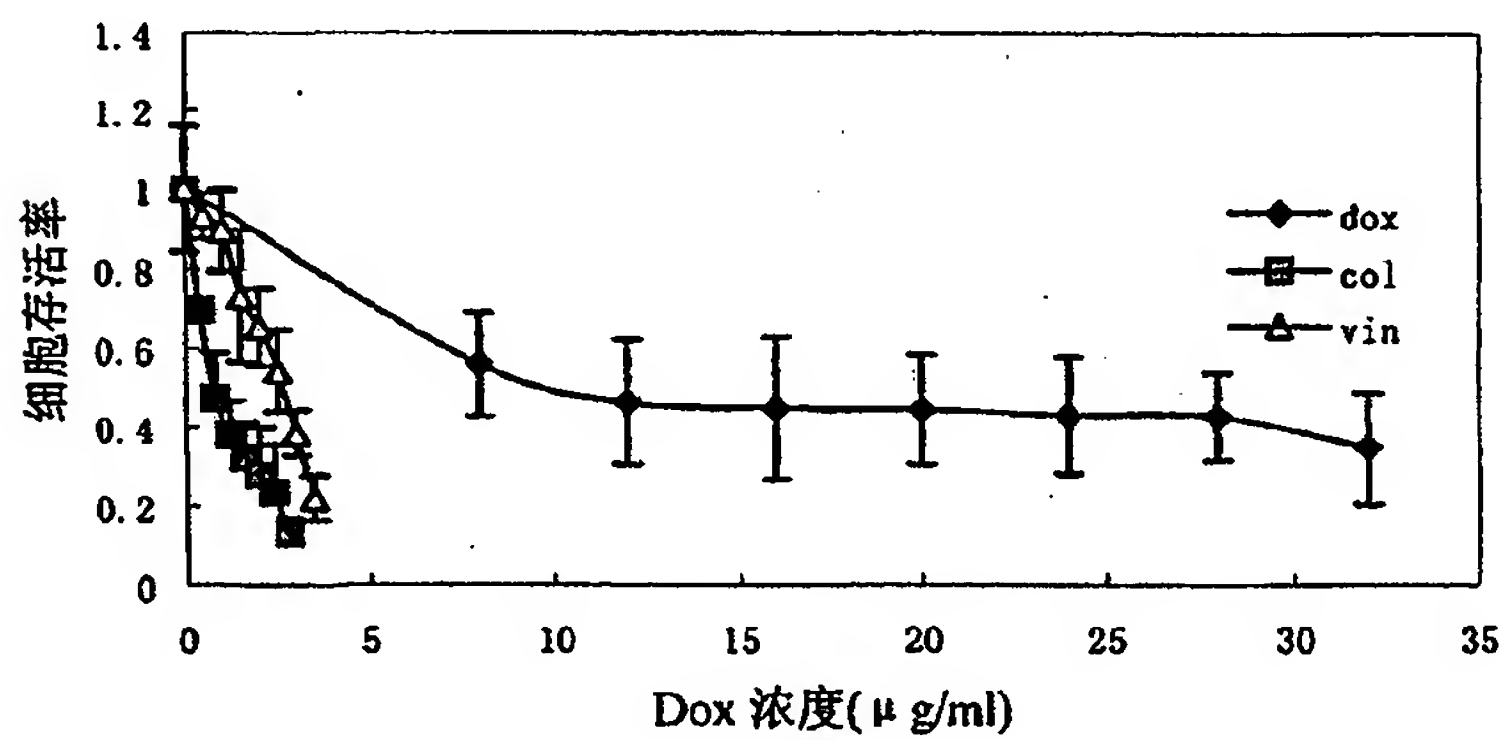


图 3

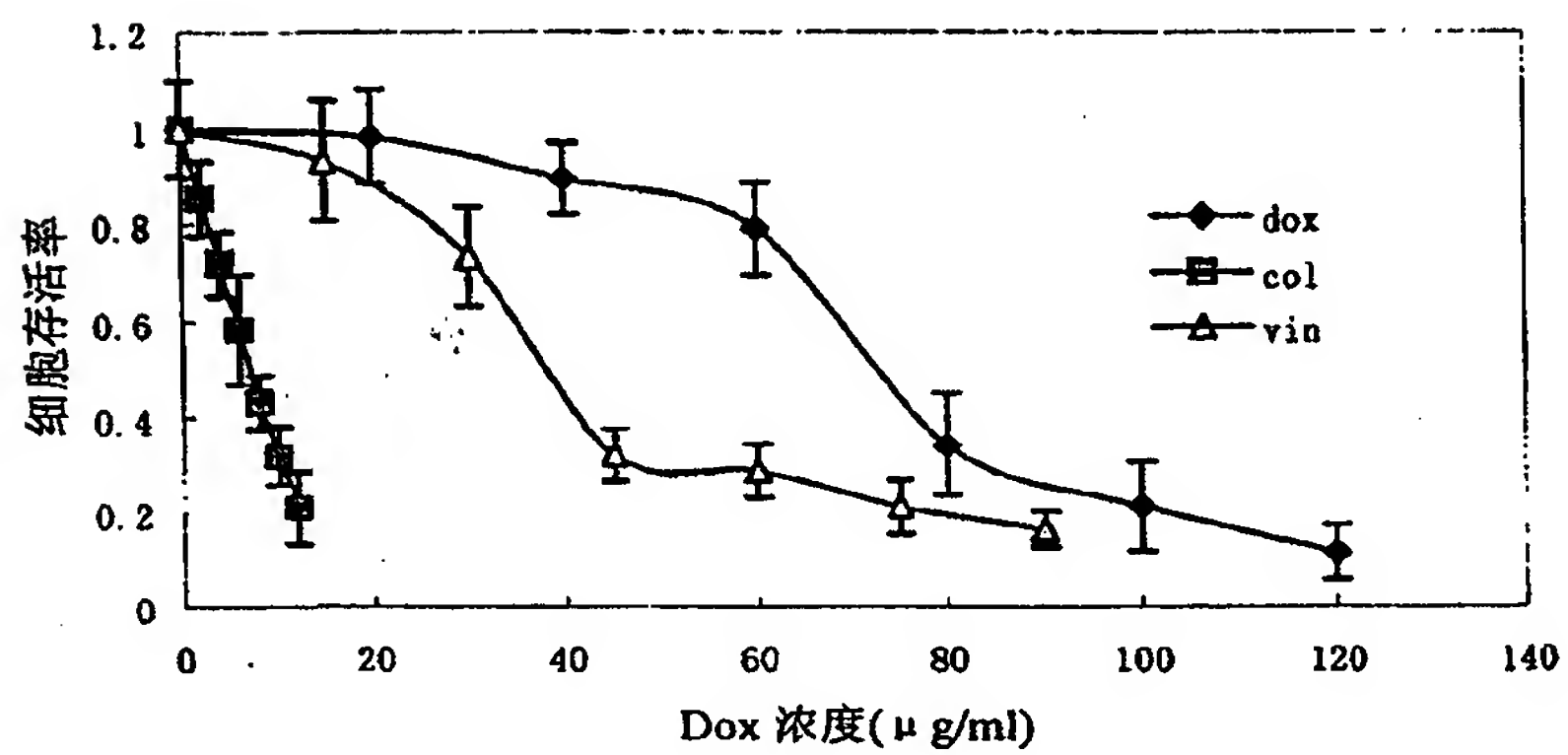


图 4

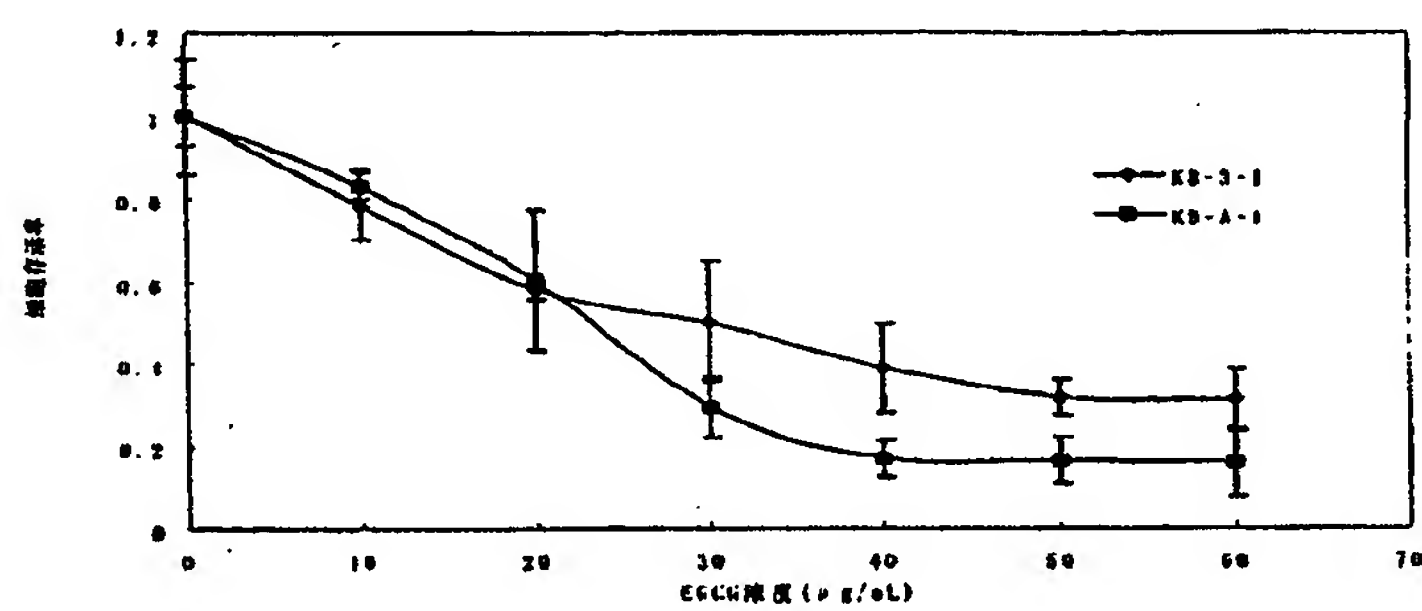


图 5

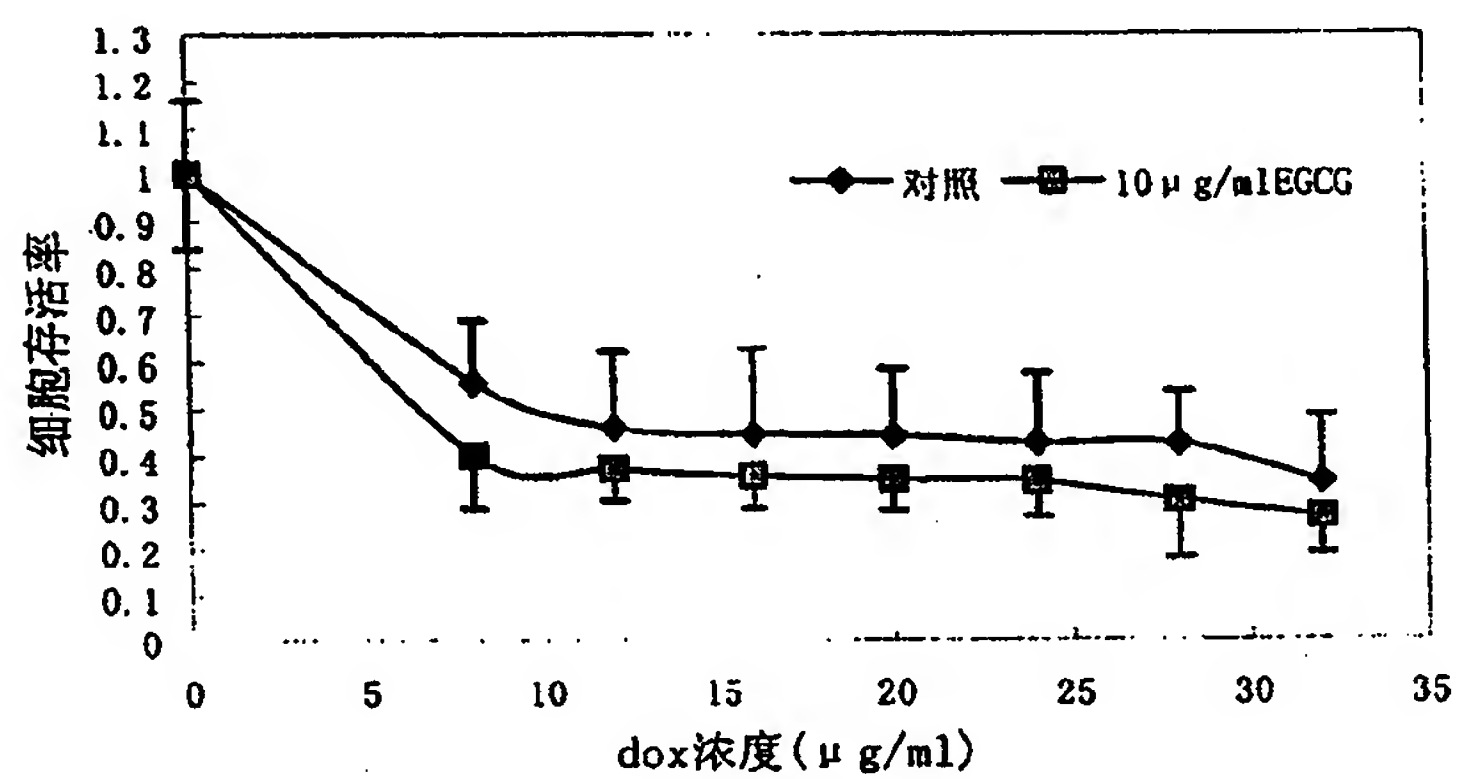


图 6